谷氨酸脱氢酶缺失对单核细胞增生李斯特菌生物被膜、毒力以及胞外蛋白表达的影响

王文静[1] 杨丽玉 刘婵娟 赵进 罗勤*

（华中师范大学生命科学学院，遗传调控与整合生物学湖北省重点实验室，武汉 430079）

摘要：【目的】探究谷氨酸脱氢酶缺失对单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, Lm)生物被膜、毒力以及胞外蛋白表达的影响。【方法】利用微孔板法，检测谷氨酸脱氢酶缺失对Lm生物被膜形成能力的影响；比较野生株、谷氨酸脱氢酶缺失株EGDeΔ*gdhA*以及回复菌株EGDeΔ*gdhA*+pERL3-*gdhA*的溶血活性以及对棉铃虫幼虫的半数致死量，检测谷氨酸脱氢酶缺失对Lm毒力的影响；利用iTRAQ技术对Lm野生株EGDe与谷氨酸脱氢酶缺失株EGDeΔ*gdhA*的胞外蛋白进行分离与鉴定，并对差异表达蛋白进行生物信息学分析。【结果】与野生株相比，缺失株形成的生物被膜量显著降低（P≤0.01），溶血活性下降，对棉铃虫幼虫的半数致死量上升了1.6倍；蛋白质组学结果显示，缺失谷氨酸脱氢酶后差异性表达的胞外蛋白有62个，其中47个蛋白表达量下调，15个蛋白表达量上调。进一步将这些差异表达蛋白质同COG数据库进行比对以及功能聚类分析，结果显示，这些蛋白质的功能分别属于碳水化合物转运与代谢、核苷酸转运和代谢、能量合成与转运相关、

基金项目：国家自然科学基金项目（31571931）；
遗传调控与整合生物学湖北省重点实验室开放课题资助(GRIB201709)
华中师范大学中央高校基本科研业务费项目资助（CCNU18TS024）
通讯作者：罗勤，E-mail: qinluo@mail.ccnu.edu.cn

转录以及细胞膜细胞壁相关蛋白等16个功能类别；其中碳氮代谢以及能量转运相关蛋白数量最多，为24个，占所鉴定出的差异蛋白总量的38.71%。表明谷氨酸脱氢酶是单核细胞增生李斯特菌中碳氮代谢和能量转运中的关键酶。同时，我们发现有3个与细菌粘附以及生物被膜形成相关的蛋白表达量下降。以上结果较好地解释了EGDeΔ*gdhA*在基础培养基中生长缓慢和生物量显著性下降，以及生物被膜形成能力降低的现象。【结论】谷氨酸脱氢酶在单核细胞增生李斯特菌生物被膜、毒力以及胞外蛋白表达方面有重要作用。

关键词：单核细胞增生李斯特菌，谷氨酸脱氢酶，生物被膜，毒力，iTRAQ，胞外蛋白表达。

Effect of glutamate dehydrogenase deletion on biofilm formation, virulence and extracellular proteins expression of *Listeria monocytogenes*

WANG Wen-jing　YANG Li-yu　LIU Chan-juan　ZHAO Jin　LUO Qin*

(Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation and Integrative Biology, College of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan 430079, China)

Abstract:[Objective]To explore the effect of glutamate dehydrogenase deletion on biofilm formation, virulence and extracellular proteins expression of *Listeria monocytogenes.*[Methods] The effect of glutamate dehydrogenase deletion on the formation of *L.monocytogenes* biofilms was examined using a microtiter plate method. The hemolytic activity, the semi-lethal dose of *Helicoverpa armigera* (Hübner)in wild-type,

GDH-deficient and revertant strains were compared.The differentially expressed extracellular proteins between the wild strain and GDH-deficient strain were identified and analyzed by iTRAQ technology. [Results]Compared with wild strains, the amount of biofilm formed by the GDH-deficient strains was significantly decreased ($P \le 0.01$), as well as the hemolytic activity, but its semi-lethal dose on *Helicoverpa armigera* (Hübner) was increased 1.6 fold. The functions

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31571931) and the project of Hubei Key；The project of Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation and Integrative Biology (GRIB201709); Self-determined research funds of CCNU from the colleges'basic research and operation of MOE"(CCNU18TS024)

*Corresponding author: LUO Qin, E-mail: qinluo@mail.ccnu.edu.cn

of all sixty-two differential expressed extracellular proteins identified by iTRAQ were cataloged into 16 functional groups, including carbohydrate transport and metabolism, energy synthesis and transport, transcription, cell membrane protein related to cell wall and so on. Among them, the most dominant groups including 24 proteins, accounting for 38.71% of total differential expressed proteins, are related to carbon and nitrogen metabolism as well as energy transport, suggesting that glutamate dehydrogenase is a key enzyme in carbon and nitrogen metabolism as well as energy synthesis and transport for *L.monocytogenes*. The slow growth and reduced biomass of EGDe*ΔgdhA* compared to EGDe in minimal essential medium were in agreement well with these proteomic

results. In addition, the expressions of three proteins from EGDe*ΔgdhA* associated with bacterial adhesion and biofilm formation were also significantly decreased. [Conclusion]Deletion of glutamate dehydrogenase reduces bacterial biofilm formation and virulence, affects significantly the extracellular protein expression in *L.monocytogenes*.

Key words: *Listeria monocytogenes*, Glutamate dehydrogenase, Biofilm, Virulence, iTRAQ, Extracellular protein.

单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*，以下简称 Lm)是人畜共患李斯特菌病(listeriosis) 的主要病原菌，能引起人及动物产生脑膜炎、败血症、流产等症状[1]。Lm 在入侵宿主的过程中，可通过吞噬作用或表达内化素蛋白，侵入宿主细胞；然后在细胞溶血素 LLO（由 *hly* 基因编码）以及两种磷脂酶的作用下逃离吞噬泡进入宿主细胞胞质[2]；最后在其膜蛋白 ActA 的作用下，进行细胞之间的传播[3]。Lm 在自然界中广泛存在，并能在多数固体表面形成生物被膜。生物被膜是细菌抵御外界不良环境的一种重要形式，它可以显著增强细菌对各种杀菌剂的耐受能力，极大增强细菌的抗逆性，给食品行业造成严重困扰[4-5]。细菌分泌的胞外蛋白对于病原菌的生存、侵染以及生物被膜的形成都有着重要的作用[6-7]。Lm 基因组编码大量具有信号肽的蛋白质，但迄今为止只有部分蛋白质在胞外蛋白中被检测到[8]。

谷氨酸脱氢酶（Glutamate dehydrogenase, GDH），广泛存在于动物、植物以及微生物中，是一种催化NH_4^+和α-酮戊二酸合成谷氨酸或其逆反应的酶[9]。该酶在三羧酸循环、氮代谢调控、能量产生和信号转导中起着重要作用，且在猪链球菌2型中，GDH已经证明与毒力相关[10-11]。在Lm中GDH是由*gdhA*基因编码，其对Lm生存以及毒力方面的具体作用尚无研究报道。

本研究比较分析了Lm野生株（EGDe）、GDH缺失株（EGDeΔ *gdhA*）和GDH缺失回复株（EGDeΔ *gdhA*+pERL3-*gdhA*）三种菌株的生物被膜形成能力以及对棉铃虫幼虫的毒力，并利用iTRAQ技术对EGDe与EGDeΔ *gdhA*的胞外蛋白进行了蛋白质组学分析，从而探究GDH在Lm的生物被膜形成能力、毒力以及胞外蛋白表达方面的重要作用。

1. 实验材料与实验方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株与质粒

单核细胞增生李斯特菌野生菌株 EGDe（血清型 1/2a, 全基因组序列已[12]）、温度敏感型穿梭整合质粒 pLSV101 以及高拷贝表达质粒 pERL3 为德国维尔茨堡大学微生物系 Werner Goebel 教授馈赠。

1.1.2 引物

表 1 本实验中所用到的引物

Table 1 The primers used in this study

Primers	Sequences
P1：*gdhA* A-F	ACAGGATCCGAACGCCTTAT
P2：*gdhA* A-R	ATAAGTAGCCGATTTCACGAC
P3：*gdhA* B-F	AAATCGGCTACTTATATAAAGTTCTATTCGG
P4：*gdhA* B-R	GGTGAATTCTATTATTACGGGCTTC
P5：*gdhA*-ck-F	AAGGTGGCTCTGACTTTGATC
P6：*gdhA*-ck-R	ATAACAAGGTTACCAGGTGC
P7: *gdhA*-*Xba*I-F	TAATCTAGATAAAACTCAACCAAGAGAAGG
P8: *gdhA*-*Bam*HI-R	ATGGGATCCCTGAGTTCTCAAATCTTACAG
P9：pERL3-ck-F	GAAAACCGCTACGGATCACATC
P10：pERL3-ck-R	CCAACCTGCCATCACGAGATTT

1.2 缺失突变株 EGDeΔ*gdhA* 与回复菌株 EGDe*ΔgdhA*+pERL3-*gdhA* 的构建

首先采用 SOEing PCR[13]方法构建用于同源重组的穿梭质粒 pLSV101-*gdhA* (A+B)：以 EGDe 基因组为模板，使用引物 P1/ P2 和 P3/ P4 分别扩增 *gdhA* 基因上下游同源臂 A(376bp)和 B(413bp)；然后将 PCR 产物纯化后作为模板，以 P1/P4 引物对进行第二次 PCR，从而获得含有 *Bam*HI 和 *Eco*RI 酶切位点的 AB 融合片段 *gdhA* (A+B)(789 bp)，双酶切后将融合片段 *gdhA* (A+B)连接到质粒 pLSV101 上，得到质粒 pLSV101- *gdhA* (A+B)。然后按照王莉等[14]的方法将其电转入 EGDe 感受态细胞中，进行同源重组和筛选 *gdhA* 基因缺失突变子 EGDeΔ*gdhA*。所得突变子经 PCR(以 *gdhA* 基因上下游引物对 P5/P6 PCR 扩增 EGDeΔ*gdhA* 中的 *gdhA* 基因片段，以 EGDe 基因组为对照来验证 *gdhA* 基因的缺失)和测序验证为正确突

变。

以 EGDe 基因组 DNA 为模板使用引物对 P7/P8 扩增出 C 片段(包含 *gdhA* 基因 ORF 和启动子在内的 2458bp 片段)，*XbaI* 和 *Bam*HI 双酶切后，将 C 片段连接到多拷贝质粒 pERL3 上，构建 *gdhA* 基因的重组表达质粒 pERL3-*gdhA*。然后将其电转入 EGDeΔ *gdhA* 感受态细胞中，使用引物对 P9/P10 进行 PCR 检测和测序验证。

1.3 细菌生长曲线的测定

挑取待测菌株的单克隆于 5 ml BHI(Brian Heart Infusion，购自 B&D 公司)培养基中过夜复苏，次日取 2 ml 复苏的菌株接入新鲜的 100 ml MEM(minimal essential medium，配制方法参考 Premaratne [15])培养基中，混匀后，采用分光光度计(DR3900，HACH)测定菌液此时的 OD_{600}，记为 0 h 的值。继续振荡培养，每隔 2 h 检测菌液 OD_{600} 的变化，直至细菌生长状态达到稳定期。实验重复 3 次，数据采用 origin 6.1 软件分析处理。

1.4 微孔板法检测菌株的生长和生物被膜的形成

参照冯飞飞[16]与 Djordjevic[17]等的方法进行：挑取待测菌株的单克隆在 BHI 培养基中过夜复苏，将复苏后的菌液 1:50 转接到新鲜培养基中，培养至 OD_{600} 为 0.2 左右。然后取 200 µl 加到 96 孔板里，每个样品设置 6 个重复。将微孔板置于 37 ℃下培养，分别培养 24 h 与 48 h 后，先用酶标仪(BioTeK，Synergy 2) 测定各孔菌液的 OD_{600} 值，以检测菌株的生长状况。然后弃去各孔培养基，所生成的生物被膜经蒸馏水洗涤，室温干燥后，用 1% 乙二酸铵结晶紫染色，酶标仪测定其 OD_{595} 的光吸收值。所获得实验数据使用 Origin 6.1 和 SPSS 软件进行分析处理。结晶紫染色后的生物被膜，直接置于倒置显微镜下(重光 COIC XDS-1B)观察，拍照记录。

1.5 细菌溶血活性检测

参照于新惠等[18]的方法：取1 ml无菌脱纤维绵羊血，2600 r/min离心5 min，弃上清。用生理盐水洗涤血细胞沉淀，清洗三次。用50倍体积生理盐水重悬血细胞，并以1 ml每支分装于1.5 ml离心管中。将待测菌液在BHI中培养至对数中期，分别取待测菌液30 µl、50 µl、100 µl加入装有1 ml血细胞的离心管中，37℃静置培养30 min后，2600 r/min离心5 min，收集上清，检测OD_{543}nm处吸光度值。以只含有血细胞的上清作为阴性对照，以加入了等量无菌水的上清作为阳性对照。实验重复三次。数据采用origin6.1分析处理。

1.6 细菌对棉铃虫幼虫的毒性实验

参考张颖等[19]的方法：将待测菌株摇至 OD_{600} 为 0.6 左右，用 BHI 培养基将菌株进行 5 倍梯度稀释（根据预实验将 EGDe 稀释至 5^2、5^3、5^4、5^5、5^6；EGDeΔ*gdhA* 稀释至 5^0、5^1、5^2、5^3、5^4；EGDeΔ*gdhA*+ pERL3-*gdhA* 稀释至 5^0、5^1、5^2、5^3、5^4）。每个梯度使用 18 条虫子，每只虫子注射 5 μl 菌液。另注射一组 BHI 培养基为空白对照。注射后连续观察三天致死率（幼虫在触摸时无任何反应时被认为已死亡），计算细菌对棉铃虫幼虫的半数致死量 LD_{50}，采用 SPSS17.0 软件分析处理所得数据。

1.7 棉铃虫病理切片的制备

选择注射 72 h 后感染症状明显的幼虫，观察症状并用解剖剪对选取的棉铃虫幼虫第三头足到第一腹足间的中肠进行解剖。然后用苦味酸固定液进行固定，充分固定 24 h 后水洗，经过脱水，浸蜡，包埋一系列工序后，再进行切片，展片，捞片，烤片和脱蜡，最后进行 HE 染色（本实验所得病理切片由湖北百奥斯生物科技有限公司制作）。所得病理切片置于倒置显微镜下(重光 COIC XDS-1B)观察，拍照记录。

1.8 野生株 EGDe 与缺失株 EGDeΔ*gdhA* 的胞外蛋白质组鉴定

1.8.1 蛋白样品制备

将待测菌株培养至稳定期前期，用高速冷冻离心机（Eppendorf，5804R）4℃，12000 rpm 离心 1 h 收集上清液。上清液加入 3 倍体积的丙酮，在-20℃冰箱中过夜沉淀蛋白。所得蛋白用冷丙酮洗涤两次，然后置于空气中干燥，待样品干燥后用 8 M 尿素重悬蛋白，置于-80℃待用。

1.8.2 蛋白样品的胰蛋白酶消化和 iTRAQ 标记

蛋白样品用 DTT（sigma）还原 1 h，然后加入 IAA（sigma），室温避光条件下烷基化 30 min 后加入 10 mM DTT 猝灭。接着将胰蛋白酶以 1:100 的酶与底物比例加至蛋白样品中，加入 100 mM 的三乙基碳酸氢铵（pH8，T7408，Sigma），37℃下消化 18 h。消化后的蛋白脱盐并在真空中干燥。最后每组各取 100 μg 按照 AB SCIEX 公司试剂盒（iTRAQ Reagent-8 plex Multiplex kit）说明书进行标记，野生株 EGDe 标记为 113、114、115，缺失株标记为 116、117、118。

1.8.3 蛋白样品的强阳离子交换液相色谱分级（SCX）以及 LC-MS/MS 分析

将差异标记的样品混合后，使用 PolySULFOETHYL A™（200x4.6-mm，200A）的 SCX 色谱柱进行强阳离子交换液相色谱分级。分离后的样品脱盐后冻干，每份样品经 AB SciexTripleTOF®6600 系统的纳升级液相色谱串联质谱（Nano LC-MS/MS）分析采集数据。

1.8.4 数据的生物信息学分析

所得原始数据通过 Mascot (Martrix science)软件搜索 *Listeria_monocytogenes*_UniProt 和常见的 MS 污染物数据库，进行查库鉴定及定

量分析。根据蛋白质丰度水平，以差异倍数大于 1.2 或小于 0.8 且经统计检验 P-value 值小于 0.05 的蛋白视为缺失株 EGDeΔ*gdhA* 与野生株 EGDe 之间的差异性表达蛋白，利用 Microbes Online Comparative Genomics Database (MOCGD) (http://www.microbesonline.org/)对差异性表达的蛋白进行 COG 聚类分析。

2. 实验结果

2.1 GDH 缺失对单核细胞增生李斯特菌生长的影响

如图 1 所示，野生株 EGDe、GDH 缺失株 EGDeΔ*gdhA* 以及 GDH 高拷贝质粒回复株 EGDeΔ*gdhA*+pERL3-*gdhA* 在对数前期的生长情况无明显差异。但是在对数后期以及稳定期前期，缺失 GDH 后，细菌的生长较为缓慢，且生物量显著低于野生株；同时，回复菌株 EGDeΔ*gdhA*+pERL3-*gdhA* 的生长速率却快速增大，对数末期的生物量显著高于野生株和缺失株，然后细菌生长开始下降，直至降到与野生株和缺失株类似的稳定期的生物量。

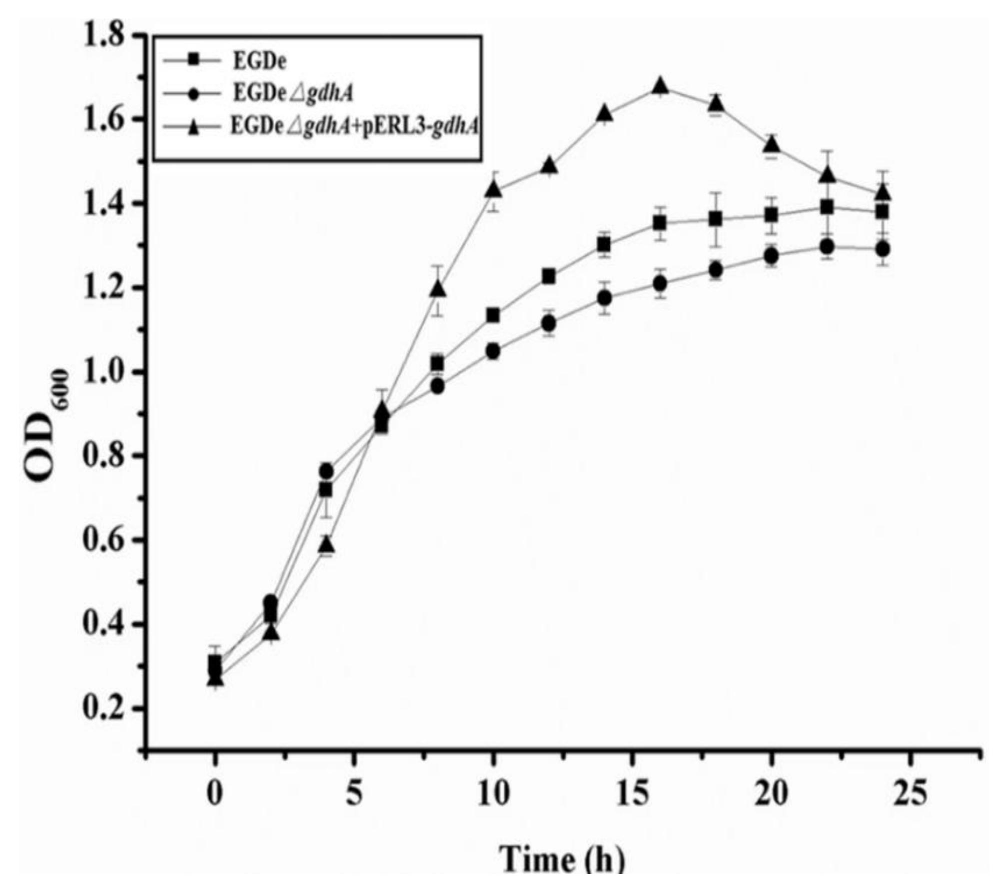


图 1 EGDe、EGDeΔ*gdhA* 和 EGDeΔ*gdhA*+pERL3-*gdhA* 生长曲线的比较

Fig.1 Comparison of the growth of EGDe, EGDeΔ*gdhA* and EGDeΔ*gdhA*+pERL3-*gdhA* in minimal essential medium.

2.2 GDH 缺失对单核细胞增生李斯特菌生物被膜形成的影响

如图 2 (a)和(b)所示，将野生株 EGDe、缺失株 EGDeΔ*gdhA* 以及回复菌株

EGDeΔ*gdhA*+pERL3-*gdhA* 静置培养，当保持三种菌在培养 24 和 48 小时生长量没有明显差异的条件下，我们发现 EGDeΔ*gdhA* 形成的生物被膜显著低于野生株 EGDe（P≤0.01），而回复菌株形成的生物被膜量基本与 EGDe 的相当。如图 2（c）是培养 48 h 后在显微镜下观察到的结果：野生株与回复菌株形成的生物被膜较为致密，而缺失株形成的生物被膜较为疏松，与图 2（b）结果一致。这说明缺失 GDH 会造成 Lm 生物被膜形成能力受到影响，导致生物被膜形成量下降。

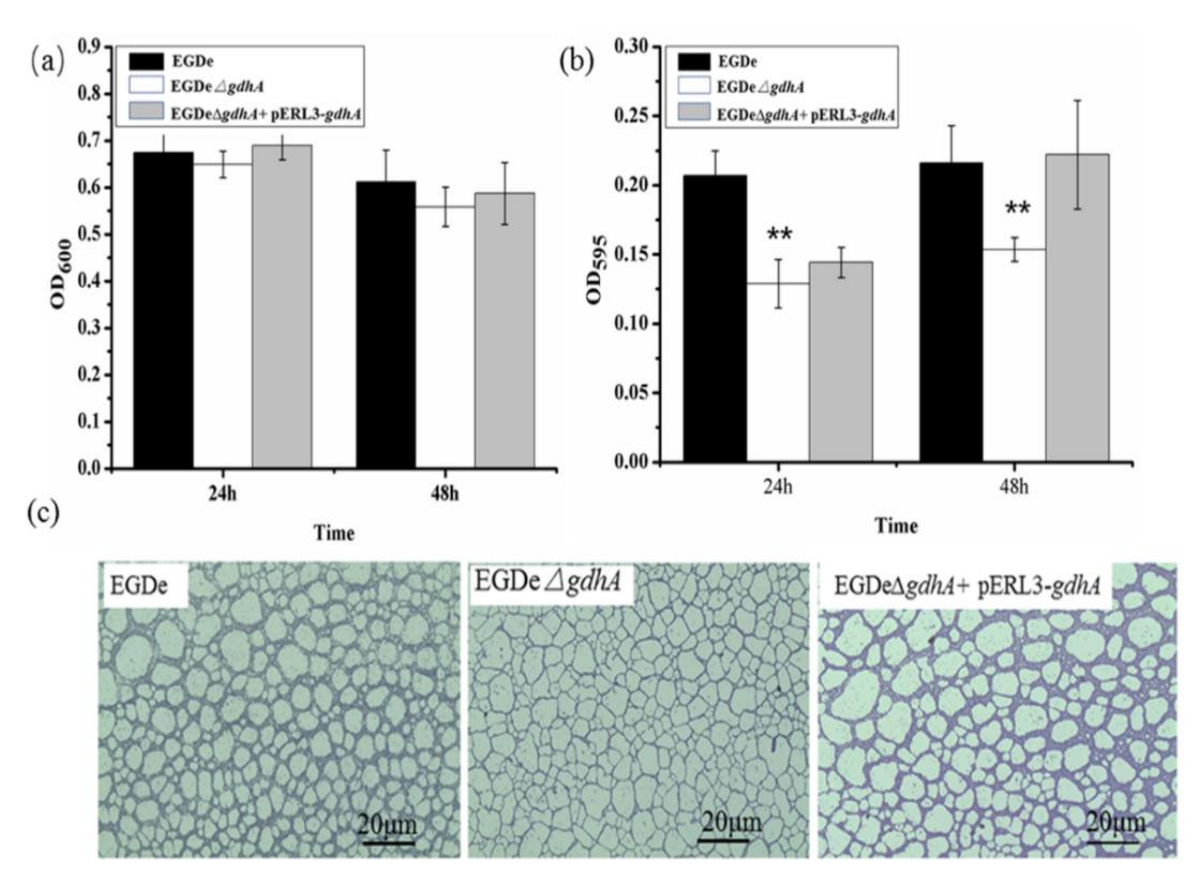


图 2 EGDe 、EGDeΔ*gdhA* 和 EGDeΔ*gdhA*+pERL3-*gdhA* 生物被膜形成能力的比较

Figure 2 Biofilm formation by EGDe, EGDeΔ*gdhA* andEGDeΔ*gdhA*+pERL3-*gdhA*

注：(a)三株菌株在培养 24 h 和 48 h 后的生长量。(b)三株菌株在培养 24 h 和 48 h 后的生物被膜形成量。(c)显微镜下，三种菌株形成的生物被膜结构(48 h，20×)；**：在同一培养时间段内，与野生型菌株 EGDe 相比，突变株 EGDeΔ*gdhA* 的生物被膜形成量具有极显著性差异 (P ≤0.01)。

Note: (a): The biomass of the three strains after 24 h and 48 h of cultivation; (b): Biofilm quantities for the three strains measured by microtiter plate assay after 24 hand 48 h of incubation; (c): Biofilm formed in the 48h by the three strains observed under a 20× objective; **:Significant differences of the biomass of biofilm betweenthe mutant strain EGDeΔ*gdhA* and the wild type strain EGDe during the same culture time (P≤0.01).

2.3 GDH 缺失对单核细胞增生李斯特菌毒力的影响

2. 3. 1 GDH 缺失对单核细胞增生李斯特菌溶血活性的影响

Lm 中 *hly* 基因编码的李斯特菌溶血素(Listeriolysin O，LLO)能裂解宿主吞噬体膜，导致细菌逃逸到宿主细胞质中，是细菌在宿主细胞内繁殖所必需的最重要的毒力因子。*hly* 基因缺失将导致细菌溶血活性降低，细菌毒力极大下降[20]。为了检验 GDH 缺失是否会影响细菌的溶血活性，我们比较了 LLO 在 EGDe、EGDeΔ*gdhA* 和 EGDeΔ*gdhA*+pERL3-*gdhA* 中的活性差异。如图 3 所示，当野生株 EGDe 菌液体积增加时，菌液中 LLO 蛋白含量增高，导致红细胞溶血程度增加。但与 EGDe 相比，缺失株 EGDeΔ*gdhA* 溶血活性显著性减弱，且随着菌液体积的增加，这种差异越来越明显。意外的是，回复株 EGDeΔ*gdhA*+pERL3-*gdhA* 的溶血活性始终低于 EGDeΔ*gdhA*，且不随菌液体积增加而变化。

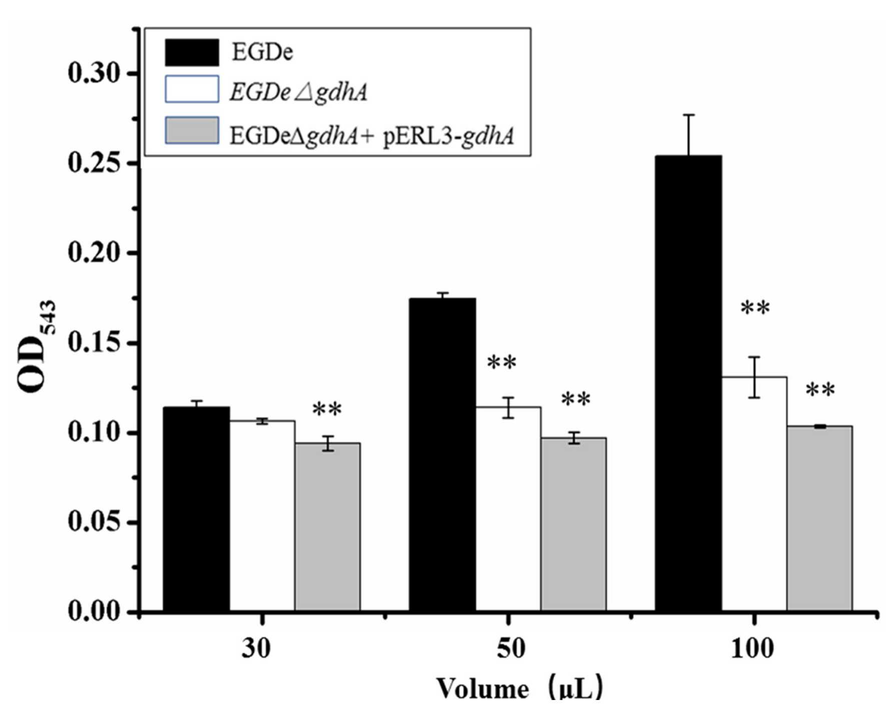


图 3 EGDe、EGDeΔ*gdhA* 和 EGDeΔ*gdhA*+pERL3-*gdhA* 的溶血活性

Fig.3 Hemolytic activity of EGDe, EGDeΔ*gdhA* and EGDeΔ*gdhA*+pERL3-*gdhA*

2.3.2 GDH 对单核细胞增生李斯特菌侵染棉铃虫幼虫的影响

为进一步从活体水平探究 GDH 缺失是否会影响 Lm 的毒力，我们比较了野生株 EGDe、缺失株 EGDeΔ*gdhA* 以及回复株 EGDeΔ*gdhA*+pERL3-*gdhA* 对棉铃虫幼虫的致死能力。结果如表 2 所示，注射 BHI 培养基的棉铃虫幼虫在培养 72 h 后皆没有死亡（活动正常，可以正常化蛹），而注射了不同 Lm 菌株的棉铃虫幼虫均出现不同程度的死亡。与 EGDe 相比，EGDeΔ*gdhA* 的半数致死量（LD_{50}）上升了 1.6 倍左右，这说明缺失 GDH 使 Lm 的毒力下降。但有趣的是 GDH 回复菌株对棉铃虫的半数致死剂量不仅没有回复到野生株水平，且是三株菌株中最低的，该结果与溶血实验结果一致。

表 2 EGDe、EGDeΔ*gdhA* 和 EGDeΔ*gdhA*+pERL3-*gdhA* 对棉铃虫的半数致死剂量(LD_{50})

Table 2 The semi-lethal dose of EGDe, EGDeΔ*gdhA* and EGDeΔ*gdhA*+pERL3-*gdhA* on *Helicoverpa armigera*(Hübner)

菌株 Strain	半数致死剂量 LD_{50}(cfu)
BHI	(死亡条数为 0)
EGDe	3.89*10^6cfu
EGDeΔ*gdhA*	6.34*10^6cfu
EGDeΔ*gdhA*+pERL3-*gdhA*	4.07*10^7cfu

2.3.3 棉铃虫幼虫中肠病理切片的观察

如图 4 所示，在注射野生株 EGDe 72 h 后，棉铃虫肠道细胞几乎全部溶解，仅剩下较为完整的基底膜。但是注射缺失株 EGDeΔ*gdhA* 后，肠道细胞虽然也发生了轻微的溶解与空泡化现象，但溶解程度显著低于注射野生株 EGDe 的幼虫，这也说明了缺失 GDH 后, Lm 对棉铃虫的侵染能力下降。而注射了回复株 EGDeΔ*gdhA*+pERL3-*gdhA* 的棉铃虫肠道细胞同样发生了溶解和空泡化，但其程度基本与缺失株的相似，该结果也与前面的溶血活性以及半数致死量的测定结果较为一致。

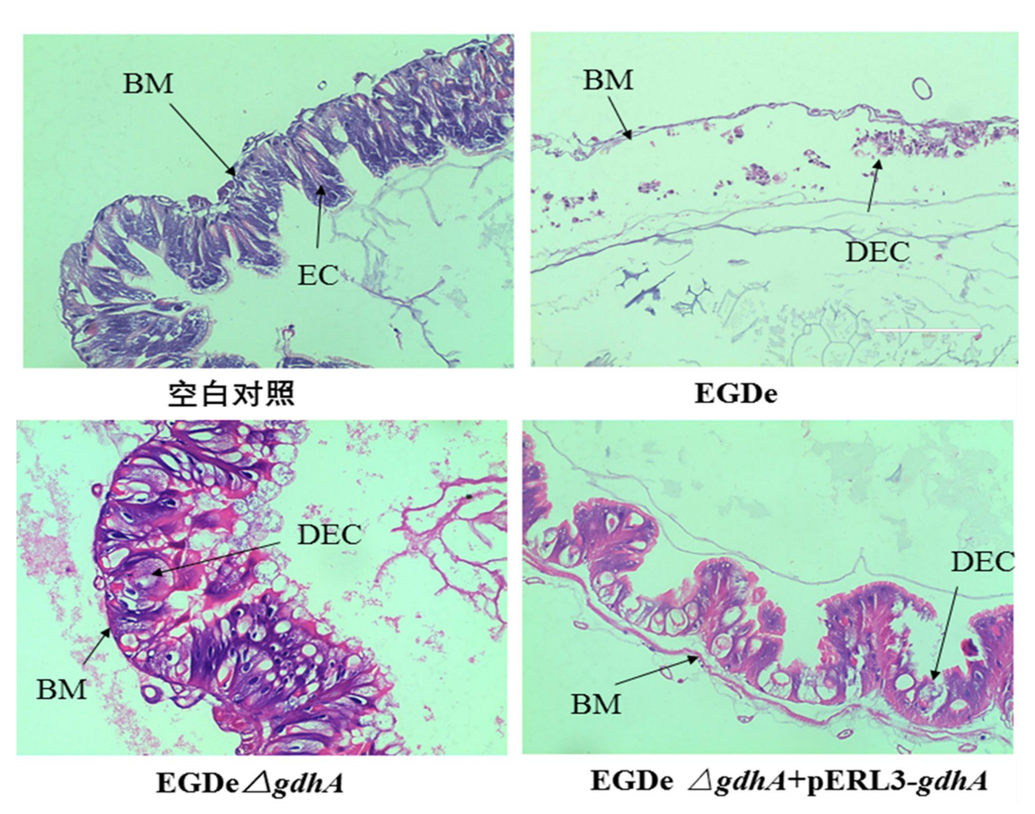


图 4 注射 EGDe、EGDeΔ*gdhA* 和 EGDeΔ*gdhA*+pERL3-*gdhA*72h 后的棉铃虫肠道病理切片。
注：BM 为棉铃虫肠道基底膜；EC 为棉铃虫肠道细胞;DEC 为溶解的肠道细胞。
Fig.4 Tissue section of the midgut of *H. armigera* after 72 h injection of EGDe, EGDeΔ*gdhA* and EGDeΔ*gdhA*+pERL3-*gdhA*.
Note: BM, Basement membrane; EC, Epithelial cell; DEC, Dissolved epithelial cell.

2. 4 野生株 EGDe 与缺失株 EGDeΔ*gdhA* 的胞外蛋白质组学结果

如前所述，GDH 的缺失会导致 Lm 的生物被膜形成能力与毒力下降。而细菌分泌的胞外蛋白对病原细菌的生存与侵染以及生物被膜的形成有着重要的作用。为进一步探究 GDH 对 Lm 胞外蛋白表达的影响，我们利用 iTRAQ 技术对 Lm 野生株 EGDe 与谷氨酸脱氢酶缺失株 EGDeΔ*gdhA* 的胞外蛋白进行分离与鉴定，并对差异表达蛋白进行生物信息学分析。

依据蛋白质丰度水平，以差异倍数大于 1.2 或小于 0.8 且经统计检验 P-value 值小于 0.05 的蛋白视为野生株 EGDe 与缺失株 EGDeΔ*gdhA* 之间的差异性表达蛋白。实验重复三次，共鉴定出差异性表达蛋白个数 62 个。与 EGDe 相比，在 EGDeΔ*gdhA* 中下调表达的蛋白有 47 个，上调 15 个（见表 3）。利用 MOCGD 对差异性表达的蛋白进行 COG 聚类分析，除了 6 个蛋白无 COG 功能注释外，其余蛋白被归属于碳水化合物转运与代谢（11 个）、脂质运输和代谢转运（2 个）和氨基酸转运与代谢（4 个）、核苷酸转运和代谢（1 个）、能量产生与转化（6 个）、翻译后修饰，蛋白质周转，分子伴侣（3 个）、转录相关（7 个）、和细胞壁/膜/包膜产生（4 个）等 16 个功能类别，涵盖了细菌的大部分生理功能（如图 5 所示）。其中碳氮代谢与能量转运相关蛋白数量最多（功能分类归属于碳水化合物转运与代谢、脂质运输和代谢转运、氨基酸转运与代谢、核苷酸转运以及代谢、能量产生与转化相关蛋白），为 24 个，占所鉴定出的差异蛋白总量的 38.71%。表明谷氨酸脱氢酶是 Lm 中碳氮代谢和能量转运中的关键酶。

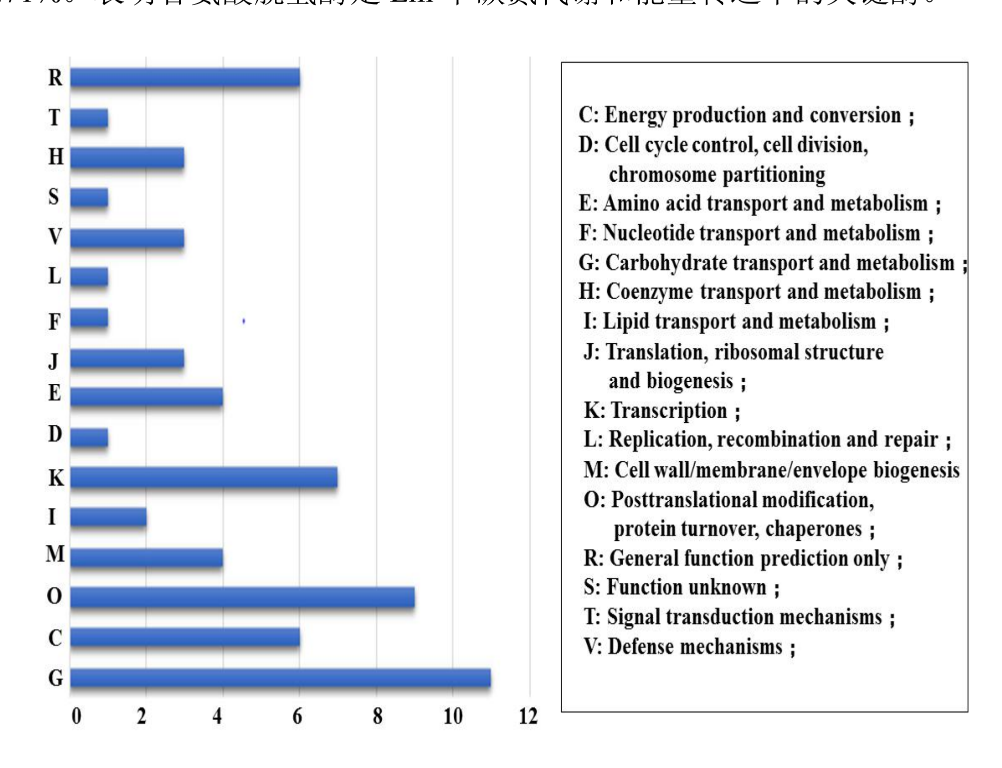


图 5 差异表达蛋白 COG 聚类分析结果

Fig5 COG clustering analysis of differentially expressed proteins

表 3 iTRAQ 方法鉴定到的差异性表达蛋白

Table 3 Differentially expressed proteins identified by iTRAQ

COG[1)]	Locus[2)]	Putative function	[3)]MM/Pie	[4)]Protein score	ratio[5)]
(G) Carbohydrate transport and metabolism					
	lmo0859	Uncharacterized Protein	0.65/46.95	110.97	0.71
	lmo2455	2-phosphoglycerate dehydratase	4.70/46.47	40.79	1.29
	lmo2848	L-rhamnose isomerase	5.31/48.07	39.33	1.67
	lmo2665	PTS galacticol transporter subunit IIC	8.74/45.57	36.51	1.48
	lmo2734	Sugar hydrolase	5.14/100.90	67.64	0.19
	lmo0401	Alpha-mannosidase	4.95/100.00	45.52	0.63
	lmo0359	D-fructose-1,6-biphosphate aldolase	5.02 /31.60	41.25	0.51
	lmo1217	Endo-1,4-beta-glucanase and to aminopeptidase	5.14/38.90	36.33	0.58
	lmo2771	Beta-glucosidase	5.28/55.10	31.94	0.49
	lmo2002	PTS sugar transporter	5.94/17.20	38.98	0.75
	lmo2556	Fructose-1,6-bisphosphate aldolase	5.2/30.00	37.70	0.52
(C): Energy production and conversion					
	lmo0520	Transcriptional regulator	4.91/38.00	61.54	1.53
	lmo1811	ATP-dependent DNA helicase RecG	5.69/78.00	98.2	0.52
	lmo1183	Hypothetical protein	6.86/22.20	42.97	0.50
	lmo0396	Pyrroline-5-carboxylate reductase	5.08/28.10	32.57	0.55
	lmo0300	Phospho-beta-galactosidase	4.99/53.60	30.36	0.55
	lmo0067	Dinitrogenase reductase ADP-ribosylation protein	4.89/37.70	328.92	0.48
(O): Posttranslational modification, protein turnover, chaperones					
	lmo2069	Class I heat-shock protein (chaperonin) GroES	4.60/100.60	241.72	2.26
	lmo1059	Thioredoxin	4.83/199.20	41.1	3.58
	lmo2206	protease subunit B	64.97 /97.50	95.97	0.43
	lmo0520	Transcriptional regulator	4.91/38.00	61.54	1.53
	lmo1811	ATP-dependent DNA helicase RecG	5.69/78.00	98.2	0.52
	lmo1183	Hypothetical protein	6.86/22.20	42.97	0.50
	lmo0396	Pyrroline-5-carboxylate reductase	5.08/28.10	32.57	0.55
	lmo0300	Phospho-beta-galactosidase	4.99/53.60	30.36	0.55
	lmo0067	Dinitrogenase reductase ADP-ribosylation protein	4.89/37.70	328.92	0.48
(M): Cell wall/membrane/envelope biogenesis					
	lmo0582	Peptidase P60	8.56/42.70	515.01	2.13
	lmo2555	Glycosyl transferase family 1	6.91/47.89	55.32	0.377
	lmo2754	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	6.93/48.07	100.2	0.77
	lmo2185	Sortase B	5.033/21.05	59.56	0.78
(I) Lipid transport and metabolis					
	lmo0354	Fatty-acid--CoA ligase	6.268/58.10	30.86	1.36
	lmo1753	Diacylglycerol kinase	5.64/34.02	37.46	0.47
(K)Transcription					
	lmo0630	PTS fructose transporter subunit IIA	5.57/77.72	52.06	3.05

lmo2606	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	4.797/34.91	42.97	1.37
lmo1408	PadR family transcriptional regulator	8.82/20.72	97.05	0.36
lmo1878	Transcriptional regulator MntR	5.46/16.39	45.26	0.68
lmo0258	DNA polymerase III subunit beta	4.70/42.43	30.84	0.58
lmo1899	ATP-dependent helicase DinG	5.78/106.06	45.71	0.30
lmo2107	DeoR family transcriptional regulator	5.28/28.40	38.58	0.30
(D) Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning				
lmo1606	DNA translocase FtsK	5.317/87.79	50.78	1.46
(E) Amino acid transport and metabolism				
lmo1663	Asparagine synthetase	5.02/48.99	38.39	1.20
lmo1628	Tryptophan synthase beta chain	5.50/43.70	62.16	0.51
lmo2539	Serine hydroxymethyltransferase	5.53/45.12	41.06	0.76
(J)Translation, ribosomal structure and biogenesis				
lmo1530	Queuine tRNA-ribosyltransferase	7.21/42.92	38.02	1.31
lmo1459	Glycyl-tRNA synthetase subunit alpha	4.85/34.30	83.53	0.65
lmo2656	30S ribosomal protein S12	11.24/15.10	54.09	0.66
(F) Nucleotide transport and metabolism				
lmo2155	Ribonucleotide-diphosphatereductase alpha	5.59/87.39	115.43	0.36
(L) Replication, recombination and repair				
lmo1320	DNA polymerase III PolC	5.26/162.70	80.30	0.76
(V) Defense mechanisms				
lmo0607	ABC transporter ATP-binding	5.56/63.3 0	52.10	0.35
lmo1964	lABC-type multidrug transport system	6.35/33.29	34.51	0.44
lmo0028	Similar to E.coli microcin C7 self-immunity protein	4.48/34.38	61.81	0.67
(S)Function unknown				
lmo2181	Sortase	5.35/28.62	47.73	0.79
(H) Coenzyme transport and metabolism				
lmo1042	Molybdopterin biosynthesis protein	5.167/45.00	38.26	0.44
lmo1093	NH(3)-dependent NAD(+) synthetase	5.07/30.59	32.26	0.68
lmo2770	Glutathione synthetase	4.92/88.56	36.36	0.47
(T) Signal transduction mechanisms				
lmo1935	Protein-tyrosine/serine phosphatase	4.92/36.63	36.18	0.63
(R) General function prediction only				
lmo0919	Antibiotic ABC transporter ATP-binding protein	8.929/59.10	74.01	1.44
lmo1760	Geranylgeranylglyceryl phosphate synthase-like protein	5.109/25.36	37.53	0.42
lmo1226	LacI family transcription regulator	5.79/38.81	43.98	0.72
lmo1537	Predicted GTPase	5.12/47.1 0	37.98	0.63
lmo2232	Hypothetical protein	4.70/49.10	38.21	0.77
lmo2359	Hypothetical protein	4.89/31.07	31.27	1.58

Note:

[1)]COG: functional category according to the Cluster of Orthologous Genes using the Microbes Online Comparative Genomics Database (MOCGD) (http://www.microbesonline.org/).

[2)]Locus tag was obtained from NCBI (nr) *Listeria monocytogenes* EGD-e database with the common name in parentheses.

[3)]Putative functions were assigned from NCBI (nr) *Listeria monocytogenes* EGD-e database.

[4)]Theoretical molecular masses (expressed in kDa) and isoelectric point (expressed in pI).

[5)]Changes in protein levels was reported as the ratio between the glutamate dehydrogenase deletion mutant EGDe*ΔgdhA* and wild-type EGDe.

3. 讨论

谷氨酸脱氢酶属于氨基酸脱氢酶家族，谷氨酸在 GDH 的作用下，转化为α-酮戊二酸和氨，前者进入 TCA 循环；α-酮戊二酸和谷氨酰胺在谷氨酸合成酶（GOGAT）的作用下，合成谷氨酸，进入氮代谢途径。在细菌中，两个代谢分支必须很好地协调，才能在任何给定的营养环境中都能实现较高的生长率[21]。我们研究发现 Lm 缺失 GDH 后，菌株在 MEM 培养基中生长缓慢，且在对数末期以及稳定期前期生物量显著性低于野生株 EGDe。在枯草芽胞杆菌[21]、地衣芽胞杆菌[22]中缺失 GDH 后，细菌的生物量也降低，这些结果均表明谷氨酸脱氢酶是细菌中联系碳氮代谢的关键酶。同时，我们通过蛋白质组学的方法验证了缺失 GDH 后，差异性表达蛋白中碳氮代谢和能量转运相关蛋白占总蛋白的 38.71%，暗示 EGDeΔ*gdhA* 在基础培养基中生长缓慢和生物量显著性下降可能是由于缺失 GDH 后，细菌碳氮代谢和能量转运失衡，从而导致细菌体内合成生长所需物质减少所致。而回复菌株 EGDeΔ*gdhA*+pERL3-*gdhA* 在对数末期的生物量显著高于野生株和缺失株，则有可能是因为回复表达 GDH 基因 *gdhA* 的质粒 pERL3 是多拷贝质粒，GDH 的过量表达加快了细菌碳氮代谢和能量转运，从而导致 Lm 生长速率增快，生物量增多。但这种变化似乎并不能持久，因为回复菌株的生长最终还是稳定到与野生株相似的水平。

生物被膜是细菌抵御外界不良环境的一种重要形式，它可以显著增强细菌对各种杀菌剂的耐受能力，极大增强细菌的抗逆性。缺失 GDH 后，EGDeΔ*gdhA* 生物被膜形成能力显著低于野生株 EGDe；同时，在 EGDe 与 EGDeΔ*gdhA* 的胞外差异表达蛋白组中，我们发现有三个已被验证过与细菌粘附和生物被膜形成相关的蛋白(Lmo1226、Lmo2555、Lmo2365)在 EGDeΔ*gdhA* 发生了显著下调表达。其中，LacI 家族转录调节子 Lmo1226 对于 Lm 的粘附起到重要作用[23]；缺失 Lmo2555 的同源蛋白 BgsB 能造成在粪肠球菌生物被膜形成能力显著下降[24]；Lmo2365 的同源蛋白 RofA 已被 Beckert S 等人证明对于 A 链球菌粘附和入侵真核细胞不可缺少[25]。这些结果共同说明 GDH 的缺失，会使 Lm 的生物被膜形成能力下降。

在猪 2 型链球菌中，GDH 是新近发现的一个与细菌毒力相关的蛋白，通过 GDH 蛋白电泳图谱可以区分菌株的毒性高低[11]。GDH 在 Lm 中是否与毒力相关目前尚无研究报道。我们发现与野生株相比，GDH 缺失株的溶血活性显著下降，对棉铃虫幼虫的半致死量上升了约 1.6 倍，这暗示缺失 GDH 后 Lm 的毒力有所下降。尽管 Lm 的主要毒力蛋白（PlcB、ActA、Mpl、LLO、PlcA、PrfA）没有

在本研究条件所得的差异性表达的胞外蛋白中检测到，但我们发现 Lm 的毒力相关蛋白 P60（编码基因 *lmo0582*）与 ClpB（编码基因 *lmo2206*）发生了差异性表达（见表 2）。已有文献表明，敲除 ClpB 编码基因后，突变体对小鼠的侵染能力下降[26]；而 P60 可以加速细胞分裂和肌动蛋白尾部形成，在 Lm 侵染宿主细胞过程中发挥着重要作用，敲除 p60 后，Lm 对小鼠的毒力下降[27]。因此，我们推测 GDH 也可能通过一定途径影响 Lm 的致病能力，具体机制亟待深入探讨，这将是我们今后研究的重点之一。至于回复菌株 EGDeΔ*gdhA*+pERL3-*gdhA* 的溶血活性以及对棉铃虫的半数致死率均低于缺失株和野生株，其原因尚不清楚，推测可能是因为所 GDH 的过量表达也可能破坏细菌体内的碳氮代谢平衡，从而抑制了 Lm 毒力因子如 LLO 和（或者）PrfA 的活性，这与张颖[19]在研究全局转录调控因子 CodY 的过量表达结果一致，充分说明细菌的致病能力与其体内的碳氮代谢密切相关。

综上所述，我们的研究结果表明，GDH 在 Lm 生物被膜形成能力、毒力以及胞外蛋白表达方面有着重要的作用。

参考文献：

[1]Kumaraswamy M, Do C, Sakoulas G, et al. *Listeria monocytogenes* Endocarditis: Case Report, Review of the Literature, and Laboratory Evaluation of Potential Novel Antibiotic Synergies. International Journal of Antimicrobial Agents, 2018, 38(1):51-60.

[2]Price R, Jayeola V, Niedermeyer J, et al. The *Listeria monocytogenes* Key Virulence Determinants *hly* and *prfA* are involved in Biofilm Formation and Aggregation but not Colonization of Fresh Produce. Pathogens, 2018, 7(1):7-18.

[3]Pillich H, Puri M, Chakraborty T. ActA of *Listeria monocytogenes* and Its Manifold Activities as an Important Listerial Virulence Factor.Current Topics in Microbiology and Immunology, 2017, 399:113-132.

[4]Jr W M D. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? Clinical Microbiology Reviews, 2002, 15(2):155-166.

[5]Mah T F, O'Toole G A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends in Microbiology, 2001, 9(1):34-39.

[6]Trost M, Wehmhöner D, Kärst U, et al. Comparative proteome analysis of secretory proteins from pathogenic and nonpathogenic Listeria species. Proteomics, 2005, 5(6):1544-1557.

[7] Gilan I, Sivan A. Effect of proteases on biofilm formation of the plastic-degradingactinomycete *Rhodococcus ruber* C208. Fems Microbiology Letters, 2013, 342(1):18–23.

[8]Desvaux M, Dumas E, Chafsey I, et al. Comprehensive appraisal of the extracellular proteins from a monoderm bacterium: theoretical and empirical exoproteomes of *Listeria monocytogenes* EGD-e by secretomics. Journal of Proteome Research, 2010, 9(10):5076-5092.
[9]Treberg J R, Banh S, Pandey U, et al. Intertissue differences for the role of glutamate dehydrogenase in metabolism. Neurochemical Research, 2014, 39(3):516-526.
[10] Plaitakis A, Berl S, Yahr MD. Neurological disorders associated with deficiency of glutamate dehydrogenase. Annals of Neurology, 1984, 15(2):144–153.
[11]Okwumabua O, Persaud J S, Reddy P G. Cloning and characterization of the gene encoding the glutamate dehydrogenase of *Streptococcus suis* serotype 2. Clin Diagn Lab Immunol, 2001, 8(2):251-257.
[12]Glaser P, Frangeul L, Bunchrieser C, et al. Comparative genomics of Listeria species[J]. Science, 2001, 294(26): 849-852.
[13] Luo Q, Zhou Q C, Deng L F, et al. Some essential elements on the *inlC* promoter for PrfA-dependent regulation in *Listeria monocytogenes*. Acta Microbiologica Sinica, 2007, 47(1): 22-28.
[14]王莉，冯飞飞，张强，等. 单核细胞增生李斯特菌毒力基因 *inlB*/*actA* 双缺失突变株的构建. 生物技术通报, 2010, 0(11): 182-185.
Wang L, Feng F F, Zhang Q, et al. Construction of a mutant strain of *Listeria monocytogenes* with a deletion of inlB and actA. Biotechnology Bulletin, 2010, 0(11): 182-185.
[15]Premaratne R J, Lin W J, Johnson E A. Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*.Applied & Environmental Microbiology, 1991, 57(10):3046-3048.
[16]冯飞飞，张强，王莉,等. 毒力基因调控蛋白 PrfA 促进单核细胞增生李斯特菌生物被膜的形成[J]. 微生物学通报, 2011, 38(9):1450-1457.
Feng F F, ZHANG Q, WANG L,et al. The virulence regulator PrfA plays a significant role in the *Listeria monocytogenes* biofilm formation[J]. Microbiology China, 2011, 38(9):1450-1457.
[17]Djordjevic D, Wiedmann M, Mclandsborough L A. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. Appl Environ Microbiol[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2002, 68(6):2950-2958.
[18]于新惠,张颖,王文静,罗勤.*rmlB* 基因在单核细胞增生李斯特菌耐药性、生物被膜形成和毒力方面的作用[J].微生物学通报,2017,44(01):161-171.
Yu X H, Zhang Y, Wang W J, et al. Contribution of *rmlB* in envelope-acting a antibiotic resistance biofilm formation and virulence in *Listeriamonocytogenes*[J]. Microbiology China, 2017, 44(1): 161-171.
[19]张颖,汤雨倩,沈怡,罗勤.CodY 在单核细胞增生李斯特菌运动和毒力方面的作用[J].中国生物工程杂志,2017,37(07):56-63.
ZHANG Y,TANG YQ ,SHEN Y et al.The role of CodY in the regulation of flagellar motility and virulence in *Listeria monocytogenes*[J]. China Biotechnology，2017，37(7):56-63.

[20]Ren Y H, Yi-Jing L I, Wang X S, et al. Cloning and sequence analysis of the hly gene of *Listeria Monocytogenes*[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2004, 35(1):46-49.
[21]Katrin Gunka, Fabian M. CommichauControl of glutamate homeostasis in *Bacillus subtilis*: a complex interplay between ammonium assimilation, glutamate biosynthesis and degradation[J]. Molecular Microbiology, 2012,85(2):213-224.
[22]Tian G, Wang Q, Wei X, et al. Glutamate dehydrogenase (RocG) in *Bacillus licheniformis* WX-02: Enzymatic properties and specific functions in glutamic acid synthesis for poly-γ-glutamic acid production. Enzyme & Microbial Technology, 2017, 99(06):9-15.
[23]Glenn. Genes involved in attachment of *Listeria monocytogenes* to abiotic surfaces[D]. Leicester: University of Leicester, 2014.
[24] Theilacker C, Sava I, Sanchez-Carballo P, et al. Deletion of the glycosyltransferase bgsB of *Enterococcus faecalis* leads to a complete loss of glycolipids from the cell membrane and to impaired biofilm formation[J]. BMC Microbiology, 2011, 11(1):67-78.
[25] Beckert S, Kreikemeyer B, Podbielski A. Group A streptococcal *rofA* gene is involved in the control of several virulence genes and eukaryotic cell attachment and internalization[J]. Infection & Immunity, 2001, 69(1):534-537.
[26]Chastanet A, Derre I, Nair S, et al. clpB, a Novel Member of the *Listeria monocytogenes* CtsR Regulon, Is Involved in Virulence but Not in General Stress Tolerance[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(4):1165-1174.
[27] Pilgrim S, Kolb-Mäurer A, Gentschev I, et al. Deletion of the gene encoding p60 in *Listeria monocytogenes* leads to abnormal cell division and loss of actin-based motility[J]. Infection & Immunity, 2003, 71(6):3473-3784.